

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**Conjugates of biologically stable polymers and polynucleotides for treating systemic lupus erythematosus.**Patent Number: ☐ [EP0438259](#), B1Publication  
date: 1991-07-24

Inventor(s): COUTTS STEPHEN (US); CONRAD MICHAEL J (US)

Applicant(s): JOLLA PHARMA (CA)

Requested  
Patent: ☐ [JP2001354569](#)Application  
Number: EP19910300262 19910115Priority Number  
(s): US19900466138 19900116; US19900494118 19900313IPC  
Classification: A61K39/44; A61K47/48; A61K48/00EC  
Classification: [C07H21/00C4](#), [A61K47/48R2T](#)Equivalents: AU640730, AU6941891, CA2034197, DE69120303D, DE69120303T, DK438259T, ES2090233T, ☐ [FI107514B](#), ☐ [FI923241](#), GR3021113T, ☐ [IE910131](#), NO303940B, NO922781, ☐ [PT96503](#), ☐ [US5162515](#), ☐ [WO9110426](#)Cited patent(s): [US4191668](#); [US4650675](#); [WO8609628](#)

---

**Abstract**

---

Chemically defined conjugates of biologically stable polymers, such as copolymers of D-glutamic acid and D-lysine, and polynucleotide duplexes of at least 20 base pairs that have significant binding activity for human lupus anti-dsDNA autoantibodies. The duplexes are preferably homogeneous in length and structure and are bound to the polymer via reaction between an amino-reactive functional group located at or proximate a terminus of each duplex. These conjugates are tolerogens for human systemic lupus erythematosus.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## ⑫ 公表特許公報(A)

平5-505520

⑬ 公表 平成5年(1993)8月19日

⑭ Int. Cl.<sup>9</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求  
予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

C 12 N 15/11  
A 61 K 31/70  
37/02ABB  
ABC8314-4C  
8314-4C※

(全 13 頁)

⑮ 発明の名称 全身性紅斑性狼瘡の治療のための生体内で安定なポリマーおよびポリヌクレオチドの複合体

⑯ 特 願 平3-503584

⑰ 出 願 平3(1991)1月15日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)7月16日

⑲ 国際出願 PCT/US91/00293

⑳ 国際公開番号 WO91/10426

㉑ 国際公開日 平3(1991)7月25日

優先権主張 ㉒ 1990年1月16日 ㉓ 米国(US) ㉔ 466,138

⑳ 発 明 者 コンラッド, マイケル ジェ      アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129 サンディエゴ, ペナノイ.  
 ㉑ 出 願 人 ラ ホヤ ファーマシユーティ      アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121 サンディエゴ, ナンシカル カンパニー      リッジ ドライブ 8455  
 ㉒ 代 理 人 弁理士 山本 秀策  
 ㉓ 指 定 国 FI, JP, NO  
 最終頁に続く

## 請求の範囲

1. (a) 生体内で安定なポリマーと、(b) 各々が該ポリマーに結合した、少なくとも約20個の塩基対よりなる多様な二本鎖ポリヌクレオチドとの複合体であり、該二本鎖が各々ヒト全身性紅斑性狼瘡の抗dsDNA自己抗体に対して著しい結合活性を有する、複合体。
2. 前記生体内で安定なポリマーが、D-グルタミン酸(E)とD-リジン(K)とのコポリマーであり、分子量が約5,000から約50,000であり、そしてE:Iモル比率が約40:40である、請求項1に記載の複合体。
3. 前記二本鎖の長さが実質的に均一である、請求項1もしくは2に記載の複合体。
4. 前記二本鎖が、ヌクレオチド組成において実質的に均一である、請求項3に記載の複合体。
5. 前記二本鎖の長さが30から250bpである、請求項1、2、3、もしくは4に記載の複合体。
6. 前記二本鎖が末端の1つまたはその近くでポリマーに結合する、請求項1、2、3、4、もしくは5に記載の複合体。
7. 前記二本鎖が、二本鎖の一方の鎖の末端の1つにまたはその近くに位置する官能基と、前記ポリマーの末端アミノ基との反応により該ポリマーに結合する、請求項6に記載の複合体。
8. 前記二本鎖ポリヌクレオチドが、異なる2から4塩基

の相補的な多量体反復ユニットにより構成される、請求項1、2、3、4、5、6、もしくは7に記載の複合体。

9. 前記二本鎖ポリヌクレオチドが、

ポリd(GC):ポリd(CG)、ポリd(AT):ポリd(TA)、

ポリd(IC):ポリd(CP)、ポリd(AC):ポリd(TG)、もしくは

ポリd(AG):ポリd(TC)である、請求項8に記載の複合体。

10. 前記二本鎖ポリヌクレオチドが、(AC)<sub>20</sub>:(TG)<sub>20</sub>である、請求項1もしくは2に記載の複合体。

11. 薬学的に受容され得る注射可能な賦形剤とともに処方される、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10に記載の複合体を含む、狼瘡治療のための薬剤組成物。

12. 少なくとも約20個の塩基対よりなる一本鎖ポリヌクレオチドであって、末端の1つにまたはその近くに、逆離アミノ基と反応する官能基を有し、そして相補的な一本鎖ポリヌクレオチドにアニールされると、ヒト全身性狼瘡の抗dsDNA自己抗体に対する著しい結合活性を有する、一本鎖ポリヌクレオチド。

13. 前記一本鎖ポリヌクレオチドが、異なる2から4塩基の多量体反復ユニットにより構成される、請求項12に記載の一本鎖ポリヌクレオチド。

14. 請求項1に記載の複合体を作製する方法であり、

(a) 各々が少なくとも約20個の塩基対よりなり、末端の1つにまたはその近くに、アミノ基に反応する官能基を有する

多様な一本鎖ポリヌクレオチドを、ポリマーの遊離アミノ基と反応させて複合体を形成する工程；および

(b) 該ポリマーに結合された一本鎖ポリヌクレオチドに相補的な一本鎖ポリヌクレオチドをアニールさせて、二本鎖DNAのベンダント鎖を形成する工程；を包含する、方法。

全身性紅斑性狼瘡の治療のための  
生体内で安定なポリマーおよび  
ポリヌクレオチドの複合体

# 記述

## 技術分野

本発明は、自己免疫疾患である全身性紅斑性狼瘡 (SLE または「狼瘡」) の治療のための組成物に関する。詳しくは、生体内で安定なポリマー、好ましくはD-グルタミン酸 (本明細書ではI文字「E」で表す) とD-リジン (本明細書ではI文字「K」で表す) とのコポリマーと、SLEに係わる自己抗原に対する寛容性を誘導するのに効果的であると認められている特定のポリヌクレオチドとの複合体に関する。好適なコポリマーは本明細書では「D-EK」で表される。

## 背景

「免疫寛容」とは、個体が自らの組織と反応することを防ぎ、非常に長期的なおよび多くは永久的な形式の免疫抑制をもたらすメカニズムである。自己抗原に対する免疫寛容は、通常は動物の新生児の発育時に確立され、その生涯にわたって持続すると考えられている。しかし、この体系は時には不完全であり、個体の中には、典型的には生涯の後半に、自己免疫疾患にかかるものがある。このような疾患の1つがSLEで

ある。これは、個体のDNAに対する自己抗体を産生することを特徴とし、この結果、腎臓が進行性の炎症性変性に冒される。

SLEは、典型的には、シクロホスファミドまたはブレドニソンなどの幅広い非特異的免疫抑制薬を投与することにより治療される。これらの薬剤は免疫系のすべての面を抑制することが多いため、SLEの原因となる有害な機能と同様に、必要とされる有益な機能をも抑制する。従って、これら薬剤の投与においては最善の注意が必要であり、疾患の継続的な治療に対してはいつでも適切であるとは限らない。さらに、薬剤治療により全身的におよび強度に免疫抑制されている個体は、他の合併症、特に感染症に対しては危険な状態にある。

SLE治療への好ましい対策は、免疫系の正常な機能に影響を及ぼさずに、SLEに係わる自己抗原に対する免疫寛容を再確立し得る薬剤を投与することである。不幸なことに、SLEまたはさらに言えばすべての自己免疫不全に対して、その疾患に関連する自己抗原に対して寛容的でありまた特異的である治療方法は現在のところ存在しない。本発明の複合体は、SLEに対してこのような治療法を提供する手段である。

Bonaccorafi, Katzらの研究グループにより、D-EKとハプテンおよび様々な抗原との複合体を使用して、特異的な免疫寛容を誘導する研究が行われ、発表されている。彼らの初期の研究は、モルモットおよびマウス中の合成ハプテン2,4-ジニトロフェニル (DNP) の複合体に係わるもので、この複合体が

DNPに対する寛容性を誘導し得ることが示された。これらの初期の研究は、ブタクサ抗原Eおよびベンジルベニシロイル (BP0) などの他のハプテン/抗原にも広められた。米国特許第4,191,668号および第4,220,565号参照。

米国特許第4,191,668号 (実施例IV) は、D-EKと、子ウシの胸腺DNAをDNAアーゼで1回消化して単離したオリゴヌクレオチドとの複合体の調製について述べている。オリゴヌクレオチドは、「10個より少ないヌクレオチド」により構成されるという特徴を有した。米国特許第4,191,668号の第11欄において、この発明は自己免疫疾患の治療に対して治療上の価値を有すると述べ、SLEへの言及があるが、言及されたD-EK-オリゴヌクレオチド複合体の免疫学的効果についてはいかなるデータも提示されていない。

Katzらの研究グループはまた、ヌクレオシド-D-EK複合体の、核酸決定因子に対する寛容性を誘導する可能性を調査した。Esharら、*Immunology* (1975) 114:872-876。これに関しては、個々のヌクレオシドは、血清の抗血清における特異性の主要な決定因子であると広く考えられている。彼らはD-EKコポリマーと4個のリボヌクレオシドとの複合体をSJLまたはBalb/c系のマウスに投与し、引き続きこれら処置されたマウスをキーマーリンベットヘンシアン (ILB) - リボヌクレオシド複合体により免疫した。両方の系統において、血清の抗ヌクレオシド抗原結合能はかううじて検出可能なレベルまで低下した。これらの研究により、このような複合体はヌ

クレオシドに対する免疫寛容性を産生し得ることが示されたが、このような複合体がSLEの治療に有効であることは示されなかった。

他の研究者により、ヌクレオシドまたはDNAの他のキャリアーとの複合体が研究されている。Borelら (*Science* (1973) 181:76) は、同遺伝子系のマウスのIgG-ヌクレオシド複合体が、NZBマウス系の若い動物の疫性DNAへの抗体反応を低減させる能力を評価した。この系統はいくつかの自己免疫現象のためのモデルとして使用される。この複合体は、腎臓に蓄り糸球腎炎へと導く免疫合併症を形成する遺伝決定因子に対する抗体を産生する傾向がある。これらの研究において、処置された動物は抗疫性DNA抗体を産生する程度が著しく低下し、コントロール動物および遊離ヌクレオシド処理した動物より顕性の小さい糸球腎炎を示した。他の研究において、Park et al. (*J. Immunol.* (1974) 113:292) は、NZBマウスにおける上述の症候群の進行に及ぼすポリ-D-リジンおよび/またはレクロホスファミドに結合された疫性DNAの効果について評価した。これらの研究により、コントロールに比較して処置された動物に対しては、生存率が著しく上昇、およびDNA結合能が著しく低下することが示された。しかし、上述の研究はいずれも、ヒトSLEに係わる主要な自己抗原であるように見えるdsDNAに対する寛容性を産生することを目的としたものではなかった。

後の論文 (*Ann. NY Acad. Sci.* (1986) 471:298-308) で、Bo

relらは、SLEに対する特異的免疫療法の実現が「DNA断片を可溶性タンパク質に結合することが不可能である」ことにより阻止されていると示唆している。彼らは、Stollerによる先行文献 (Papallianら、*J. Clin. Invest.* (1980) 85:489、ならびにStollerおよびPapallian、*J. Clin. Invest.* (1980) 85:210) を引用して、SLE患者に形成された抗DNA抗体を結合するためには、最小サイズとして少なくとも10-40個の塩基対のDNAが必要であると述べている。この論文には、結合剤としてグルタルアルデヒドを使用して「10個の塩基対より幾分長い」天然のDNA断片を結合することにより作製されるオリゴヌクレオチド-免疫グロブリン複合体について述べている。該論文の図2は、DNA断片を選択するために使用される研究について述べている。この図は、BVF<sub>1</sub>血清中に抗DNA抗体を有するグルタルアルデヒドを介してヒツジ赤血球に結合される様々なDNA断片の反応度を示している。これらの試験において「70-80」で示される断片が最も反応度が高かった。この断片のサイズは、「約10個のオリゴヌクレオチド」に対応する断片81-101より「幾分大きい」と述べられている。「40-69」で示される、70-80の次に大きな断片は、断片70-80に比較して反応度が著しく低下した。当然ながら、「10個の塩基対より幾分長い」断片はサイズが不均一であり、結合手順のために、鎖の任意の部位で免疫グロブリンに結合される。さらに、二官能基性の結合剤を使用するため、結合反応においてある程度の架橋が起こることがあり得る。従って、この論文で述べられた複合

体は以下の意味において化学的に定義された部分ではない。すなわち、(a)オリゴヌクレオチドの長さが特定されていない、(b)オリゴヌクレオチド断片は様々な長さの鎖を有する、(c)オリゴヌクレオチド鎖の長さに沿った免疫グロブリンへの付着部位は任意である、(d)ある程度の架橋が存在する、および(e)結合ではなく架橋されたオリゴヌクレオチドが結合された物質から分離され得ない。

Borelらは最近、カップリング剤としてグルタルアルデヒドを使用して、全DNA消化物 (N<sub>10-100</sub>として示される) または20-30塩基対の断片 (N<sub>20-30</sub>として示される) のいずれかに結合したヒト免疫グロブリンの複合体を使用したインビトロにおける研究について報告している (*J. Clin. Invest.* (1988) 82:1901-1907)。これらの複合体は、SLE患者からのPBLにインビトロにおける免疫寛容特性を示すことが報告された。しかし、これらの複合体は、彼らの1986年の論文において報告されたものと同様、非特異的に架橋されたネットワークを産生する方法を使用して、オリゴヌクレオチドの不均一な混合物によっても産生される。従って、これら複合体の化学的性質も生物学的活性も、これらが薬剤として認可され得る程に十分に再現可能ではない。

#### 発明の開示

上述の先行技術とは対照的に、本発明者は、生体内で安定なポリマーと、ヒトSLEに対して免疫寛容原である二本鎖ポリ

ヌクレオチドとの化学的に定義された複合体を開発した。これら二本鎖は長さ、ポリマーへの付着部位、らせん構造、およびヒトSLE抗dsDNA自己抗体への結合親和性に関して定義されている。従って、これらの化学的性質および免疫寛容活性は、これらの複合体を品質管理および薬剤としての認可に従わせ得る程度に再現可能である。

従って、本発明の1つの面は、生体内で安定なポリマーと、各々が該ポリマーに結合した、ヒトSLE抗dsDNA自己抗体に対する著しい結合能を有する、少なくとも約20個の塩基対よりなる多様な二本鎖ポリヌクレオチドとの複合体である。これらの複合体の好適な実施形態においては、二本鎖は長さが実質的に均一であり、それらの末端の1つでまたはその近く (すなわち約5塩基対以内) でポリマーにカップリングされ、これにより二本鎖の各々は、二本鎖のポリマーへの付着部位から鎖の自由末端まで散らけて少なくとも約20塩基対のペンダント鎖を形成する。

これらの複合体を含有する薬剤組成物およびこれらの複合体を使用するSLEを治療する方法が本発明の別の面である。

さらに別の面は、(a)生体内で安定なポリマーと(b)様々な二本鎖ポリヌクレオチドであり、その各々およびすべてが二本鎖の鎖の1つの末端にまたはその近くに位置する官能基によりポリマーに結合されることである。この複合体はヒトSLE免疫寛容原である。

本発明のさらに別の面は、上述の複合体を作製する方法で

あり、各々が少なくとも約10個のヌクレオチドの長さを有し、末端の1つにまたはその近くに、ポリマーの遊離アミノ基と反応する官能基を有する、多様な一本鎖ポリヌクレオチドを反応させて複合体を形成する工程、およびポリマーに結合された該一本鎖ポリヌクレオチドに、相補的な一本鎖ポリヌクレオチドをアニールして二本鎖DNAのペンダント鎖を形成する工程を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1に述べる試験から得られるデータのグラフである。

図2および3は、実施例3に述べるCDスペクトルの再生である。

図4は、異なるタイプのらせん構造を有するDNAのSLB抗原清結合能を比較するグラフである。

図5～8は、実施例5に述べる試験から得られるデータのグラフである。

#### 発明を実施する形態

複合体のポリマー成分は生体内で安定している。すなわち、インビボにおける排出の半減期が数日から数カ月である。これらのポリマーはまた実質的に非免疫原性であり（すなわち、動物に投与されても免疫原性を示さない、または弱い免疫原性しか示さない）、好ましくは、定義された組成の合成の一

(GCTA)<sub>n</sub> (四量体)

(CGAT)<sub>n</sub>

ここで、 $n$ 、 $n'$ 、および $n''$ は所望の数の塩基対が提供されるように選択される整数である。同質異性の二量体 (isomeric d isomers) により構成されるポリヌクレオチド、例えば、ポリd (AC):ポリd (GT)およびポリd (AG):ポリd (CT)が最も好適である。

円二色性 (CD) スペクトルの解釈に基づいて、本発明にて使用される二本鎖はB-DNAタイプのらせん構造であると考えられる。当然ながら、本発明はこの考えにより制限されない。また、さらに総合的な分析によればZ-DNAおよび/またはA-DNAタイプのらせん構造であることもあり得る。B-DNAは、他の2つのタイプのDNAらせんのらせん長軸にほぼ直角の塩基対を有する右巻きのらせんを形成する。異なるタイプのDNAのらせん構造は、円二色性 (CD) スペクトルにより特徴付けられ得る。B形態のDNAのCDスペクトルは、(1)250nmより下の部分のスペクトルは右巻きのらせんに基づくものであり、200nmより上の波長の正の長い二色性バンドとは離れていて、240と280nmとの間の波長で明かな極小部分がある、正の二色性バンド、および(2)250nmより上に広い一重項ピークを示し、これはA形態のRNAおよびDNAのスペクトルにみられる最大値に対して、極大部分が青の方へ相対的に移動し、極大部分の中心が波長270と280nmとの間となる。DNAの他の2つのらせん形態を全体的に比較すれば、Z-DNAは、密な左巻きのらせんであり、塩基対がらせん軸の周りに左右対称に配置されていないという

本鎖より構成される。これらの平均分子量は、通常、約5,000から約200,000、好ましくは5,000から50,000の範囲である。このようなポリマーの例としては、ポリエチレングリコール、ポリ-L-リジン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、免疫グロブリン、およびL-2Xがある。特に好適なポリマーは、分子量が約5,000から約50,000およびE:Eモル比率が約80:40のL-2Xである。

上記の生体内で安定なポリマーにカップリングされる合成の二本鎖ポリヌクレオチドは、少なくとも約20bp、より一般的には少なくとも30bp、典型的には30～250bp、および好ましくは50～150bpにより構成される。好ましくは、二本鎖は長さが実質的に均一である。すなわち、集団における長さの変動が通常は、塩基対における、二本鎖の平均長さの約±20%、好ましくは±10%を越えない。また、好ましくはヌクレオチド組成が実質的に均一である。すなわち、塩基組成が約10%以上変動しない。最も好適には、ヌクレオチド組成が完全に均一である。組成物に関しては、好適な合成または組換えdsDNAは、好ましくは、以下のような2～4塩基の相補的な多量体の反復ユニット（すなわち、反復二量体、三量体、または四量体）の鎖より構成される：

(AC)<sub>n</sub> (二量体)

(TG)<sub>n</sub>

(TAC)<sub>n</sub> (三量体)

(ATG)<sub>n</sub>

特徴があり、A-DNAはより緩い右巻きのらせんを形成し、これに塩基対が長いらせん軸に対して斜めに配向され、らせんの中心から引き離されている。

これらのポリヌクレオチド二本鎖は天然のDNAにより合成され得るか、もしくは化学的または組換えの技術により合成され得る。天然または組換えにより産生される長さの長いdsDNAは（例えば、酵素により、化学的に、または機械的な切断により）消化され、（例えば、アガロースゲル、セファデックスコラムにより）所望の長さのポリヌクレオチドが得られ得る。

もしくは、長さが約10塩基までの相補的な一本鎖ポリヌクレオチドの対が、市販のDNA合成装置を使用して容易に調製され、次にアニールされて通常の手順により二本鎖が形成される。長さの長い合成dsDNAは、化学的に産生された短い鎖を酵素により伸長する（5'リン酸化の後、連結する）ことにより得られ得る。

ポリヌクレオチドはまた分子クローニングにより作製され得る。例えば、所望の長さおよび配列のオリゴヌクレオチドを上述のように合成する。これらのオリゴヌクレオチドは特定の制限部位に連結するための適切な末端を有するように設計され得る。これら複数反復したオリゴマーは縦に一列に並んで連結され、多数の複製複製を提供し得る。得られる複製物は標準のクローニングベクターに挿入され、ベクターは形質転換により適切な宿主細胞/菌体に入力される。形質転換

体は制限マーカーにより区別され、DNAの制限に有利な条件下で増殖する。ポリヌクレオチドは、制限酵素による処置および従来のサイズ分画（例えば、アガロースゲル、セファデックスカラム）により、細胞/微生物の他のDNAから区別される。

もしくは、オリゴヌクレオチドはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術により増殖される。Saito, R.K.ら、*Science* (1985) 230:1350; Sackiら、*Science* (1988) 239:487; Sambrookら、*In Molecular Cloning Techniques: A Laboratory Manual*, Vol. 12, P. 14.1-14.35 Cold Spring Harbor Press (1989)。

従来の複合体とは対照的に、本発明にて使用される二本鎖ポリヌクレオチドの各々はSLE抗血清に高い結合活性を示す。好ましくは、これらは長さが實質的に均一である。この点で、従来のポリヌクレオチドは長さが不均一であり、一部またはすべてが阻害するため上記の活性を示し得ないような鎖の混合物より形成される。ポリヌクレオチドは、実験的に示されるアッセイによりスクリーニングして、SLE抗血清との結合活性を検査する。結合活性を1.0（半最大阻害が得られる分子ヌクレオチド中のポリヌクレオチド鎖）として表わし得るファアッセイの表法が、好ましいアッセイである。1.0が約500nMより小さい、好ましくは50nMより小さい二本鎖ポリヌクレオチドは高い結合活性を有し、従って、本発明の複合体の作製に有用である。

アミノ基（例えば、D-Eのイプシロンアミノ基）を有する必要がある。このような複合体の合成は2段階において実行される。第1の段階は、上述の結合/還元反応を介して二本鎖ポリヌクレオチドの1つの鎖をポリマーにカップリングすることである。酸化3'末端リボースは、鎖を過ロウ酸酸塩により処理して5'末端リボース基を酸化リボース基に変換することにより、ポリヌクレオチドの一本鎖鎖に形成される。次に、一本鎖ポリヌクレオチドを、2-8℃でpHが約6.0から8.0のポリマーの水溶液に徐々に添加する。結合方法のすべてにおけるポリヌクレオチドとポリマーとのモル比率は、通常は約2:1から約10:1、好ましくは約5:1から10:1の範囲である。結合反応（通常は反応時間は24から48時間）の間またはその後に、水酸化シアノホウ酸ナトリウムなどの強い還元剤を添加してメルフォリノ基を形成する。次に二本鎖の複合体を複合体に添加して、この混合物を加温した後、徐々に冷却して二本鎖鎖をアニールする。複合体はゲル透過クロマトグラフィーにより分離される。

他の方法には、オリゴヌクレオチドに末端のアルデヒド官能基を形成すること、およびこれら官能基を、オリゴヌクレオチドをポリマーにその上のアミノ基を介してカップリングするために使用することが含まれる。オリゴヌクレオチドの3'末端に付与されるジウム（*gem*）、ビシナル（*vicinal*）のジオールが過ロウ酸酸塩ナトリウムにより酸化され、ポリマーのアミノ基により結合し得るアルデヒドを生じ得る。ジ

ポリヌクレオチドは結合活性を保存する方法でポリマーに結合する。これは、ポリヌクレオチドをポリヌクレオチド鎖の特定の部位でポリマーにカップリングし、これにより、ポリヌクレオチドがカップリング部位から鎖の自由な（付与されてない）末端まで放れて少なくとも約30塩基対のペンダント鎖を形成することにより行われる。対照的に、Borelらの特許文獻により示されたグルタルアルデヒド結合法では、鎖に沿った任意の部位でのカップリング、および架橋が生じる。従って、この技術を使用すると、30塩基対より長い鎖が、鎖の中間部位でカップリングして、長さが實質的に30塩基対より短いペンダント鎖を形成し得る、または鎖同士が結合して、限定されないサイズの鎖ネットワークを形成し得る。

好ましくは、本発明の複合体の二本鎖ポリヌクレオチドは、これらの末端の1つのまたはこれに近い部位でポリマーにカップリングまたは結合される。オリゴヌクレオチドを生体分子に上述のように付与するためには、いくつかの結合方法が利用可能である。ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの鎖の1方の酸化3'末端リボースを、ポリマーの還元アミノ基と結合すること、および次にこの付加物を還元状態にさらしてメルフォリノ連結（*morpholino linkage*）を形成することにより形成されるメルフォリノ鎖を介して、ポリヌクレオチドの3'末端でポリマーにカップリングされる。このようなカップリングにおいては、ポリマーが少なくとも、ポリマーに結合される二本鎖ポリヌクレオチドの鎖に等しい数の遊

ールが環式系、例えば5員環の中にあると、得られる結合生成物は置換を含有する複合環式、例えば、6員メルフォリノ環またはピペリジン環である。イミノ結合生成物は、適切な還元剤、例えば、水酸化ホウ酸ナトリウムまたは水酸化シアノホウ酸ナトリウムによる還元により安定化される。ジオールが非環式であると、得られる酸化生成物はただ1つのアルデヒドを含有し、結合生成物は第2級アミンである。

ビシナルジオールの方法はまた5'末端リンカーのために使用される。これは、トリオールの第3ヒドロキシ基のシアノエチルホスホアミダイト誘導体を作製することにより行われる。ここで、残りのヒドロキシ基はビシナル、例えば3,4-シスジヒドロキシ、1-ヒドロキシメチルシクロペンタンである。この特定の場合には、ビシナルのジヒドロキシ基はジメチルシランにより阻害され、第1ヒドロキシ基は2-シアノエチル-2,2-ジイソプロピルクロロホスホアミダイトにより誘導体化される。得られる誘導体は、鎖状オリゴヌクレオチド合成の最終段階において使用され、5'末端鎖となる。オリゴヌクレオチドを脱ブロックし、ファスィオン、酸、または塩基によりジメチルシリル基を除去した後、上述のようにビシナルジオールは過ロウ酸酸塩により酸化され、アミノ基により結合される。5'末端リンカーとして使用される非環式トリオールのために、同様の方法が使用される。

別の方法は、適切なヌクレオチドの化学的性質、例えば、ホスホアミダイトの化学的性質により、アルケルアミノまた

はアルキルスルフィドリル部分をオリゴヌクレオチドの3'または5'末端のいずれかに導入することを含む。次に、求核基を、アルキルアミン誘導体の場合には、ジメチルスベリミデートなどの二官能性架橋剤の過剰分と、またはアルキルスルフィドリル誘導体に対しては、 $\alpha$ -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクニミドエステル(MBS)またはスクニミジル(4-ボードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)などのヘテロ二官能性架橋剤の過剰分と反応させるために使用し得る。過剰の架橋剤を除去すると、オリゴヌクレオチド誘導体はポリマーのアミノ基と反応する。

さらに別の方法は、改変ヌクレオチドを使用する。適切なデオキシヌクレオチド誘導体は、標準DNA合成化学により、オリゴヌクレオチドの所望の部位に、好ましくは3'または5'末端に組み入れられ得る。これらのヌクレオチド誘導体は、次にポリマーのアルキルアミノ基と特異的におよび直接に反応し得る。もしくは、上述のジアルデヒドの化学的性質によりみられる、アミン触媒のペータ解離などの副反応は、適切なヌクレオチド誘導体を付着する側の3'末端として使用することにより回避され得る。この例としては、リボースの5'メチレンの延長、すなわち、5'ヒドロキシメチル基の代わりに5'(2-ヒドロキシエチル)基がある。別案として、ポリマーに付着するオリゴヌクレオチドの3'末端ジヌクレオチドのためにホスホネートまたはホスフィネートを使用することである。

複合体がSLE免疫寛容原として、および抗dsDNA抗体の特異

的抑制生成物として作用する能力は、実施例において述べるマウスモデルにおいて評価され得る。

複合体は通常は注射による投与(例えば、腹腔内注射、または筋肉注射)に対して処方される。従って、典型的には、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液などの薬学的に受容可能な水溶性キャリアーと組み合わされる。複合体は通常は、処方の約0.01から10重量%を構成する。複合体は、SLEを引き起こす自己抗原に対する寛容性を少なくとも部分的に再確立するのに十分な量で個体に投与される。このような量は、本明細書では「治療上有効な」量と表現することがある。特定の投与規制、すなわち投与量、投与時間および反復数は特定の個体およびその個体の病態に依存する。通常は、体重1kgにつき約1から1000 $\mu$ gの複合体の投与量が与えられる。免疫寛容の状態を獲得および/または維持するために、反復投与が必要であり得る。

以下の実施例において、本発明および本発明が先行技術からは予見し得ないことを述べる。これらの実施例はいかなる意味においても本発明を制限するものではない。

(以下余白)

#### 実施例1

##### Q-2Eと個々のヌクレオチドとの複合体の試験

前述通り、本発明の複合体の開発の前に、Q-2Eと個々のヌクレオチドとの複合体がSLEネズミモデル(MZB $\times$ NZW)F<sub>1</sub>系マウス)での抗DNA応答に寛容でないことを示す試験を行った。

多くのQ-2Eを、BioMakor/Yeda (Rehovot, Israel) から得た。その相対分子量をHPLCゲル透過クロマトグラフィーにより、周知の球状タンパク質に対して標準化し、この物質を脱塩し、25Edカットオフ透析チューブにて0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 9.5に対して徹底した透析を行うことにより、サイジングした。次に2回、水に対する透析を行った。この物質を、0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 9.5緩衝液に4℃で貯蔵した。この産物の重量平均分子量は、沈降平衡、PAGE、およびHPLC-GPCと低角散乱を含む物理的方法により測定した結果、およそ28,000であった。加水分解によるアミノ酸分析の結果、このコポリマーの60%はグルタミン酸で、40%はリジンであった。

Q-2Eと、リボアデノシン、リボグアノシン、リボシトシン、およびリボチミジンとの複合体を、主にBeharら、J. Imm. (1975) 114:872に記載通りに調製した。これら複合体(ヌクレオチド-Q-2Eと称される)の各々を等しい割合で混合したものを以下の試験で用いた。

6週目および17週目の(MZB $\times$ NZW)F<sub>1</sub>雄マウスの2つのグループに、i.p.により生理食塩水もしくは1匹のマウスあたり1 $\mu$ gのヌクレオチド-Q-2Eのいずれかを、3日間毎日注射し

た。7日後、それらのマウスから採血した。2週間後、同じ処置を繰り返した。7日後、それらのマウスから採血した。1回目および2回目の採血より得た血清を、以下の抗原特異性ELISAのプロトコルを用いて抗ssDNA抗体を試験した。

ssDNAをポリスチレンプレートのウェルに固定して、狼瘡MRL(lpr/lpr)マウスの血清中の抗体と反応させる。抗ssDNA抗体をプレートのssDNAに結合する免疫グロブリンのイソタイプに特異的な、酵素を結合した抗体を添加することにより可視化する。続けて酵素の基質を添加することにより、分光光度計で読み取れる発色反応が起きる。

ssDNAを子牛胸腺dsDNAより調製する。市販の子牛胸腺dsDNAを、S-1ヌクレアーゼで処理して、均一のdsDNAを得る。dsDNAを5分間湯浴で煮沸し、すばやく冷水浴で冷却する。各ssDNAパッチを試験直前に調製する。

使用前に、6ウェルの底が平らな96プレートを一晩Steril Gard Hood中で紫外線(UV)にさらす。プレートのウェルを一夜、4℃で、10 $\mu$ g/mlのメチル化ウシ血清アルブミンを含有する生理食塩水中、1 $\mu$ g/mlの濃度の100 $\mu$ lのssDNAで被膜する。翌朝、プレートを一度、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、各ウェルに37℃で45分間、1%のウシ血清アルブミンを含有するPBS(PBSA)を200 $\mu$ l入れてブロックする。ブロック後、プレートを2回PBSで洗浄し、水分を払い落として乾燥させる。次に0.5%のTween-20を含有する1%のPBSAで希釈した試験およびコントロールの血清の100 $\mu$ lの一連の希釈液を、



適切なウェルに入れる。プレートを37℃で1時間インキュベートする。次に5回PBSで洗浄し、水分を払い乾かし乾燥させる。アルカリホスファターゼ結合のヤギ抗マウス (IgG、AおよびM) 抗体を、100マイクロリッター添加する。プレートをもう1時間37℃でインキュベートする。プレートを7回PBSで洗浄し、水分を払い乾かし乾燥させる。次に、50μlの1- $\alpha$ 酵素基質を添加して、プレートを半時間室温でインキュベートする。50μlの0.2Mリン酸水素二ナトリウム、pH8.6を添加して反応を止める。550nmでの光吸光度値を、Titertek分光光度計で各ウェルごとに測定する。

データを図1に示す。図示したポリヌクレオチド-BKはマウスにおける抗ssDNAの力価に対して検出可能な効果は示さなかった。

### 試験例2

#### SLE抗血清に対するポリヌクレオチドの結合活性試験

本発明の複合体に用いられるポリヌクレオチドに加えて、別に多様なDNAを調製して、そのSLE抗血清に対する結合活性を試験した。以下に示すこれらの試験は、本発明の複合体のポリヌクレオチドの反応性が予想も予期もされなかったことを示す。

多様な一本鎖および二本鎖のポリヌクレオチドを化学合成、および適切であれば、酵素による伸張および/もしくはアニーリングにより調製した。オリゴヌクレオチドの化学合成は亜リン酸トリエステルの化学的性質を利用したクアルテーム

(Cruscher) 固着可能カラムを用いたPharmacia Gene Assemblerで行った。固着は適切な3'-リボもしくは3'-デオキシヌクレオチドで樹脂体化された500オングストロームに固着された多孔ガラスビーズであった。オリゴヌクレオチドを固着したビーズを行うことにより制限した。10塩基より長いオリゴヌクレオチドの場合は、個々の鎖はATPおよびrT4ポリヌクレオチドポリマーゼを用いてリン酸化した。Pharmacia PD10カラムで脱塩した鎖、リン酸化した鎖をrT4のDNAリガーゼを用いて、共有結合でカップリングさせた。全ての鎖は、特定の付与末端鎖を鎖えた共通のCATG 5'末端配列を共有していた。適切であれば、dsDNAを形成するため一本鎖をアニールした。

抗原抗血清とのポリヌクレオチドの結合を測定するため2通りのアッセイを行った：(1)放射線標識したDNAを抗体との結合後、溶液から沈降させるファーストアッセイの技法、および(2)ELISA法。前者では、25μlの抗血清希釈液を、始めに0.1mg/mlのヒトガンマグロブリンを含むトリス緩衝液に加水 (TBS、0.15M NaCl、0.01M Tris、pH7.5) で固着した。これらを125μlのTBSで希釈し、50μlの<sup>125</sup>I-dsDNA (Diagnostics Products Corp., Los Angeles, CA) を各試料に添加し、そして試料を37℃で、半時間インキュベートした。次に500μlの飽和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加し、試料を4℃で15分間インキュベートし、そして遠心分離した。上清の放射活性をガンマカウンターで測定した。上清の放射活性の消滅により溶液中の抗体の濃度が直接測定された。ELISA法では、プレートのウェル

### 図1

500nm以下ではdsDNAが

ネズミ (HRL) もしくはヒトSLE自己抗体に結合するのを阻害しない一本鎖ヌクレオチドホモポリマー

	鎖長	nリ体	鎖長	nリ体
A. ホモポリリン	ポリd(G)n	12190	ポリd(A)n	3900
		2500		60
		32		32
		22		22
		12		12
		6		6
		3		3
B. ホモピリミジン	ポリd(C)n	3290	ポリd(T)n	2290
		60		60
		30		30
		24		22
		22		6
		12		3
		6		3

0 rT4DNAポリマーゼを用いて酵素で合成。分子量はばらつきがあるので、酵素により合成したオリゴマーのn値は平均値であり、それぞれ30、20個から組成したものである。

を、4℃で10μg/mlのメチル化BSAを含む生理食塩水中の10μg/ml濃度の100μlのdsDNAにより被覆した。ウェルをPBSで洗浄した後、各ウェルにPBS (PBSA) 中1%BSAの100μlを、37℃で45分間入れることによりブロックした。プレートを再度PBSで洗浄した。次に、0.5%のTween20を含む1%のPBSAで希釈した100μlの試験血清を添加した。阻害を回避するため、阻害剤 (ポリヌクレオチド等) もまた添加した。プレートを37℃で1時間インキュベートし、PBSで洗浄した。アルカリホスファターゼ阻害剤のヤギ抗体を100μl/ウェル添加し、プレートを37℃でもう1時間インキュベートした。その後、プレートを洗浄し、底質を添加し、そしてプレートを室温で半時間インキュベートした。リン酸水素二ナトリウムを添加して反応を止め、プレートを分光光度計で読み取った。

以下に掲げる図1および2は、今回の試験ではSLE自己抗体によりdsDNAの結合を有意に阻害しなかった多様な一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖ポリヌクレオチドをそれぞれ示す。

(以下余白)

## 表2

500nm以下ではdsDNAがネズミ(MRL)もしくはヒトSLE自己抗体に結合するのを阻害しない  
最高22塩基対を持つ二本鎖オリゴヌクレオチドの例

## A. ホモポリマー

## 標準

例:  $[A]_{20} : [T]_{20}$ ,  $[G]_{20} : [C]_{20}$ ,  $[I]_{20} : [C]_{20}$

## B. ヘテロポリマー

## 1. 自己置列

例:  $[O]_2-[A]_{10}-[C]_2 : [G]_2-[T]_{10}-[C]_2$

## 2. 反復二量体

例:  $[AT]_{10} : [AT]_{10}$ ,  $[AC]_{10} : [GT]_{10}$

## 3. 反復三量体

例:  $[TTC]_3 : [GAA]_3$ ,  $[TTG]_3 : [CAA]_3$

## 4. 反復四量体

例:  $[ACGT]_5 : [ACGT]_5$

(以下余白)

## 表3

約500nm以下で ( $I_{500}$ が500nmより少ない) dsDNAがヒトSLE血清もしくはネズミ(MRL)血清に結合するのを有意に阻害する二本鎖オリゴヌクレオチドの例

組成	最低n値	オリゴマーの長さ
$d(AC)_n : d(TG)_n$	20	40以上
$d(AT)_n : d(TA)_n$	20	40以上
$d(IC)_n : d(CI)_n$	20	40以上
$d(AC)_n : d(TG)_n$	20	40以上
$d(AG)_n : d(TC)_n$	20	40以上
$d(ATC)_n : d(GAT)_n$	15	45以上
$d(TAC)_n : d(OTA)_n$	15	45以上

(以下余白)

## 実施例3

## 結合活性とCDスペクトルとの相関関係

約228bpの長さのポリ(AT):ポリ(AT) (典型的なA-DNA)、約330bpの長さのポリ(GC):ポリ(GC) (典型的なZ-DNA)、平均の長さが1200bp以上の精子DNA (B-DNA型らせん構造を持つ天然DNAの例)、および上述の $(AC)_{20}:(TG)_{20}$ 二本鎖のCDスペクトルの測定を行った。これらのオリゴヌクレオチドおよびDNAのSLE抗血清結合アッセイを、ファーアッセイの技法により行った。

全てのDNAおよびオリゴヌクレオチドを標準緩衝液 (0.15M NaCl, 0.01M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) に溶解させ、SLE自己免疫血清との相対結合能を、右円偏光および左円偏光 (CD分光計を使用) の相対吸収能と比較した。血清学的なデータは、dsDNAの血清との結合を阻害する能力を示すもので、スペクトルは、ヌクレオチド残基あたりのモル消光率を表す:

$$[\theta] = 160/c \cdot L$$

式中、 $\theta$  は度で示す消光率を表し、Lはセルの径路長cmであり、cは、リッターあたりのヌクレオチドのモル濃度である。

図2は、ポリ(AT):ポリ(AT)のCDスペクトルを示す。

図3は、ポリ(GC):ポリ(GC)のCDスペクトル (黒丸で印をつけた実験)、精子のDNA (破線)、および $(AC)_{20}:(TG)_{20}$ の二本鎖 (連続した実験) を示す。

図4は、異なる形のDNAがSLE抗血清と結合する相対的な能

力を示す。合成B型DNAが、天然B型DNA (ウシ胸腺DNAを用いた) と同じ反応性を有し、A型およびZ型DNAのいずれよりも大きい反応性を有することを示す。(らせん型はCDスペクトルにより特徴づけられたが、上述のように確かではない。)

## 実施例4

 $(AC)_{20}:(TG)_{20}$ -D-BE複合体の合成

結合活性および安定性に基いて、上述の $(AC)_{20}:(TG)_{20}$ 二本鎖を寛容原を開けるため選択した。この二本鎖およびD-BEコポリマーとの複合体を、上述した好適な合成手順により調製した。この合成を以下に詳しく記す。

D-BEコポリマー、G:Lモル比40:40、

MW<sub>avg</sub>=30,000ダルトンをBioMakor, Rehovot, Israelより得た物質から調製した。このコポリマーを、25,000ダルトンの分子量カットオフ透析チューブで、最終濃度が20mg/mlになるまで、0.1MのKHCO<sub>3</sub>, pH9.5に対して透析を行った。その最終濃度は、1cmキューベット中で220nmにおける吸光度により、下記式で測定した。

$$D-BE \text{ mg/ml} = A_{220} (30,000 \text{ mg/mmol}) / (166,000 \text{ mL/cm mmol})$$

$(AC)_{20}$ を、DNAシンセサイザーで合成し、12,000~14,000ダルトンの分子量カットオフ透析チューブで、脱イオン水に対して透析を行った。得られた溶液を1cmキューベット中で280nmにおける吸光度により下記式で測定した最終濃度が15mg/mlになるよう調整した。

$$(AC)_{20} \text{ mg/ml} = A_{280} (18,106 \text{ mg/mmol}) / (458,160 \text{ mL/cm mmol})$$

0.1Mの過ヨウ素酸ナトリウムの水溶液と水とを(AC)<sub>30</sub>に添加して、DNAに対して5:1モルの過剰の過ヨウ素酸塩を含有する反応混合物とする。その混合物をよく攪拌して、4℃で15分間放置する。過剰な過ヨウ素酸塩を過剰な塩化カリウムを添加することにより沈澱させ、沈澱物を遠心分離により取り除いた。

Q-EKおよび水素化シアノホウ素ナトリウムの溶液をビベットでポリプロピレン反応容器に移し、pHを5.0から6.0になるように調整した。酸化された(AC)<sub>30</sub>を、Q-EKに滴下して、重量比率を0.035:1 (10:1モル複合体比率)にして、4℃で24~48時間激しく攪拌した。濃縮後、固体の水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に、最終濃度が1.0mg/mlに達するまで攪拌しながら添加する。反応容器をゆるくキャップし、攪拌せずに少なくとも30分間放置した。その後反応混合物を50,000ダルトンカットオフの透析チューブに移し、0.2Mのクエン酸ナトリウム、pH5.0に対して4℃にて十分に透析を行った。

次に複合体をSephacryl S-200ゲル透過クロマトグラフィーカラムにおいて、0.2Mのリン酸ナトリウム、0.5Mの塩化ナトリウム、pH7.2で精製した。画分をオリゴヌクレオチド濃度を測定するためOD<sub>260</sub>により分析し、またQ-EK濃度を測定するためにトリニトロベンゼンスルホン酸アッセイにより分析した (Albers, E. W. 及, *Analyt. Biochem.* (1983) 131:437-443)。遊離オリゴヌクレオチドからの複合体の分離を、オリゴヌクレオチド鎖の5'ヒドロキシ基を<sup>32</sup>P-キナーゼにより標識し、

により特徴を記録した。

#### 実施例5

##### 寛容原としての(TG)<sub>30</sub>:(AC)<sub>30</sub>-Q-EK複合体の試験

上述の(TG)<sub>30</sub>:(AC)<sub>30</sub>-Q-EK複合体を、MRL (1pr/1pr) ネズミモデルにおいてヒトSLEに対する試験を行った。このマウス系の遺伝的欠陥により、おそらく、自己反応性のB細胞分化にかかわるヘルパーT細胞の大幅増殖が導かれた。このことは他の自己抗体過剰と同様に、DNAに対する自己抗体の分泌をもたらす。前述通り、dsDNAに対する自己抗体はヒトSLEの特徴であり、これらの存在はヒトの病気の重篤さおよび腎臓病理学と相関関係にある。

複合体を、マウスにi.p.により注入するための所望の濃度を得るため、生理食塩水で希釈した。12週間目から16週間目の5つのグループのうち4つのグループのマウスにそれぞれ適用した。1日目の午前に採血して、その午後に注射を行った。その後、5週間以上にわたって、毎週午前中に採血して、午後に注射を行った。8週目および7週目は、採血のみを行った。グループ1 (コントロール) には、毎週1匹あたり0.1mgのQ-EKポリマーを注射し、グループ2には毎週1匹あたり0.1mgの複合体を注射し、グループ3には毎週1匹あたり0.3mgの複合体を注射し、グループ4には毎週1匹あたり1.0mgの複合体を注射した。

マウスから集めた血漿試料を1:10および1:50でトリス緩衝液 (0.1M, pH7.4) で希釈し、<sup>125</sup>I-dsDNAのかわりに<sup>3</sup>H-dsDNA

その後10%のポリアクリルアミド、5M尿素配列決定用のゲルおよびオートラジオグラフィーにより評価した。ゲルを切断し、液体シンチレーションカウンタで計数し、295%の精度を示す画分をプールし、0.01Mのクエン酸ナトリウム、0.1Mの塩化ナトリウム、pH7.0 (調製用緩衝液) に対して透析を行い、アニーリングのための調製を行った。

(TG)<sub>30</sub>を上述通りに調製し、(AC)<sub>30</sub>と同様に調製用緩衝液に対して透析を行った。(TG)<sub>30</sub>のヌクレオチドモル濃度(MNC)を、1cmキューベット中で260nmにおける吸光度を測定することにより測定した。

$$MNC(TG)_{30} = A_{260nm} / (9164 \text{ mL/cm mol})$$

(AC)<sub>30</sub>-Q-EK複合体のMNCを、260nmでの透析液の吸光度を測定することにより測定した。

$$MNC(AC)_{30}-Q-EK = A_{260nm} / (7839 \text{ mL/cm mol})$$

(TG)<sub>30</sub>を、(AC)<sub>30</sub>-Q-EK複合体に以下のようにアニールした。同じMNCの(TG)<sub>30</sub>を、ポリプロピレンまたはガラス容器中で、(AC)<sub>30</sub>-Q-EK制限試薬に添加した。その混合物を35℃になるまで温浴で熱し、10分間95℃から98℃に保った。次に溶液を徐々に<10°/時間の割合で室温まで冷却した。

アニールした産物を50,000ダルトンの分子量カットオフ透析チューブで、調製用緩衝液に対して透析を行った。十分に透析後、最終複合体を0.22μmの膜で減菌濾過した。減菌濾過の前にuv分光計、高性能ゲル透過液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、およびサーモグラフィー

Aを用いた上述のファーストアッセイの実行を行い、試料の抗dsDNA抗体の力価を測定した。ファーストアッセイの実行により得たデータを抗原結合能に変換して図5に示した (複合体はLJP-105で表す)。

処理を終えて4週間後、各グループから2匹のマウスおよびコントロールグループから残りの1匹を犠牲にし、各グループの抗dsDNA抗体の分泌レベルを、2倍に希釈した1×10<sup>5</sup>から1.5×10<sup>6</sup>の脾臓細胞を各ウェルに入れた脾臓細胞ELISAで、測定した。これらの試験の結果を図8に報告する。

複合体の試験を22週から24週目のMRLマウスにおいても実行した。再び、マウスに4週間に渡って週に1度ずつi.p.により注射を行った。抗dsDNAの血清レベルを処理後1カ月経ってから測定し、最初に得た採血前の値と比較した。個々のマウスでの抗原結合能(ABC)を表すこれらのデータを図7に示す。図7aはこれらの試験の平均データである。マウスに対する注射量を変えたことにより (複合体: 0.01, 0.1, 0.3, および1.0mg/マウス; コントロールマウスにはポリマーキャリアーおよび結合していない核酸代替物との混合物を与えた)、実験中の死亡数に変動がでた。

治療を目的とした実験により得た脾臓細胞アッセイのデータを図8に示す。これによると、コントロールと複合体により処置されたマウスとの間に著しい差異があることが再び示され、前回の血清学的な結果の正しさを確認した。コントロール実験において、可溶性dsDNAが脾臓細胞アッセイを阻害す

ることが示された。加えて、ポリスクレオチド処理された動物から得た脾臓細胞をコントロール脾臓細胞に添加しても発色の減少は生じず、むしろ効果が付加された。よって、細胞結合された複合体がアッセイを阻害することはない。

結果、複合体はi.p.、i.v.、およびi.v.経路により効能があることが示された。22週目の雄B6Lマウスに4週間に渡って、0.1mgの複合体を毎週注射し、抗dsDNAに対する抗原結合能の変化の割合を測定した。コントロールマウスでは他の実験で見られたほど、増加は起きなかったが、一方、皮下注射されたマウスと、i.p.、i.v.、およびi.v.経路で複合体投与された他のマウスでは、抗dsDNAの著しく高い力価が示された。

#### 実施例 6

この実施例は(AC)<sub>20</sub>:(GT)<sub>20</sub>-Q-EK複合体を作製する他の手順を説明するものである。

#### 60量体のクローニング

以下に挙げるプロトコールにより、分子クローニング法を用いて、60量体を作製する。5'-AATTC(GT)<sub>20</sub>G3'配列から成る64量体および5'-TCGAC(AC)<sub>20</sub>G3'配列から成る第2の64量体を合成して、標準法によりリン酸化する。オリゴマーを等モル比で混合し、徐々に冷却して二本鎖生成およびオリゴマー生成を起こす。オリゴマーの突出はそれぞれ、オリゴマーの4塩基部分の重なりによりアニールしてEcoRI部位をつくり、第2の突出でSalI部位(HincII部位と同じく)を作り出す。徐々に冷却した後、その混合物を標準法で連結させ、EcoRIもし

くはSalI部位のいずれかに挟まれた60量体ユニットに共有結合で付着したオリゴマーを形成する。オリゴマー混合物をあらかじめEcoRIおよびSalIで消化してpUC19にライゲートする。ライゲーション混合物を形質転換により*E. coli* JM107に導入する。

アンピシリン耐性コロニーを取り出し、培養し、プラスミドDNAを単離した。挿入サイズを制限酵素による消化により測定した。所望のクローンは少なくともプラスミドの2分の1すなわち30ユニットを超える60量体を含有する挿入物を有する。

得られたクローンを大規模に培養し、プラスミドを単離する。プラスミドをEcoRIおよびHincIIで消化し、一方の末端には4塩基のEcoRI突出、および他方の末端にはHincIIにより生じた平滑末端を有する60量体が放出される。オリゴマーを精製し、Q-EKにアニールする。このQ-EKは、3'Tを介してQ-EKに共有結合で付着する5'リン酸を有する4塩基オリゴマー3'TTAA-Pを有する。60量体は、アニールし、リガーゼによりQ-EK/TTAAに共有結合で付着させる。

#### 60量体のPCR生成

ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、先に引用した上述の方法により、60量体をQ-EKにカップリングさせる。

簡単に、(GT)<sub>20</sub>を、(GT)<sub>20</sub>の5'および3'末端におけるGACTおよびCTGAのような短いランダム配列で化学的に合成する(以下に記す)。短いランダム配列は、テンプレートに対す

る適切なプライマーの正確な重ね合わせを確実にする十分な長さを有す。プライマーはランダム配列に加えて、アニール反応の安定化に必要とされるいくつかの特別なGT反復配列を含む。プライマーの1つは、5'末端に、Q-EKと化学的にカップリングする特別な改変塩基もまた有する。

PCR反応は上述の方法に従い、少なくとも20サイクル行う。PCRにより作製されたオリゴマーを、HPLC等のクロマトグラフィーにより精製し、上述の手順の1つによりQ-EKに結合させる。

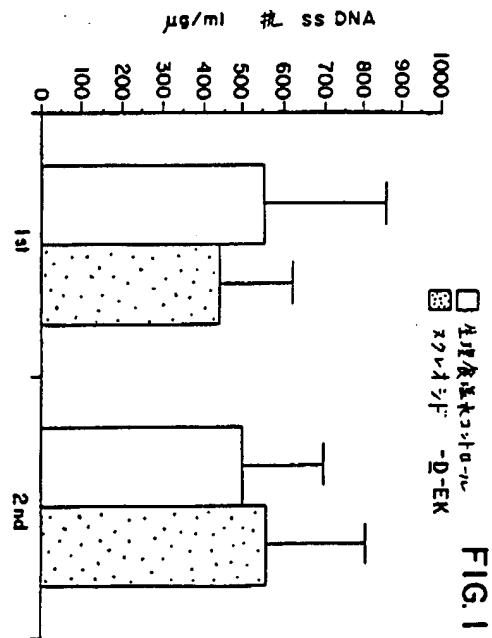
プライマー1: (CA)-GACT3'

テンプレート1: 5'-NGACT-(GT)<sub>20</sub>-CTGA3'

プライマー2: 5'-NGACT-(GT)<sub>20</sub>

テンプレート2: 3'-CTGA-(CA)<sub>20</sub>-TACG5'

※N = Q-EKカップリングに關与する改変塩基



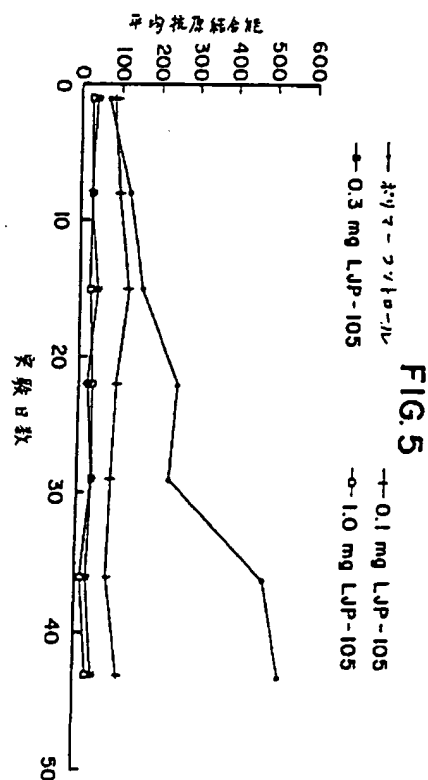
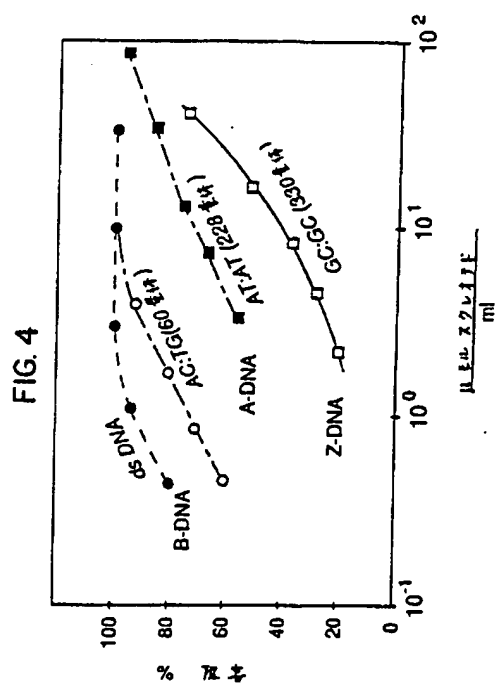
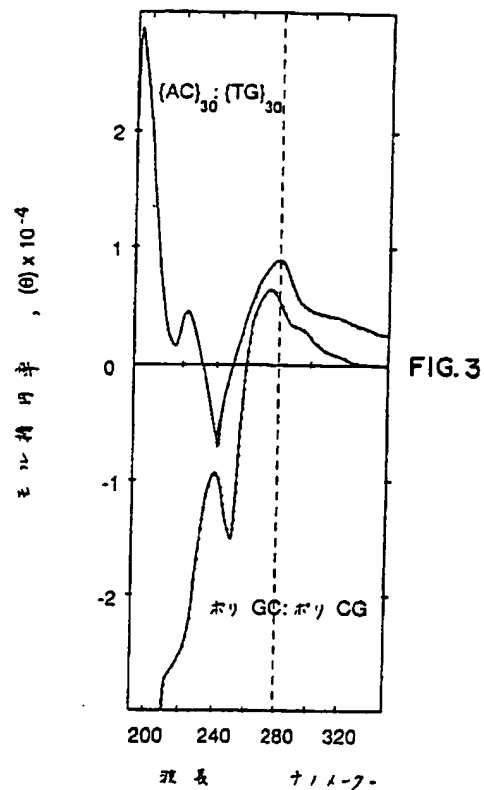
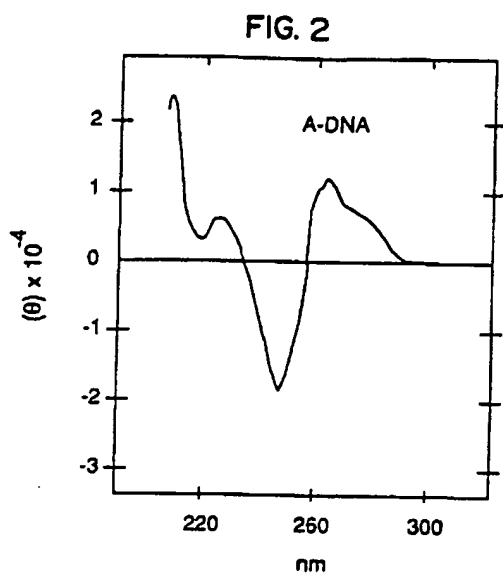
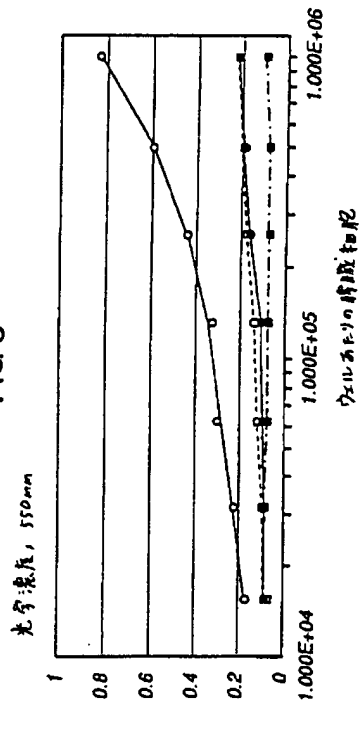


FIG. 6

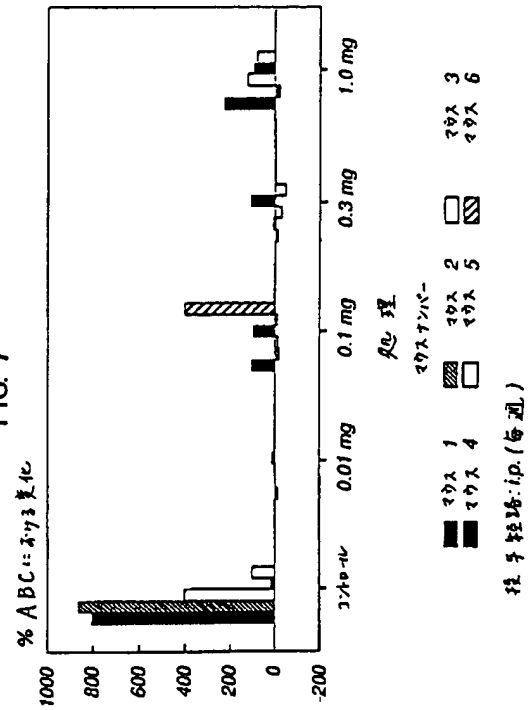


処理方法

○ コントロール  
● 0.1 mg/ml  
□ 0.3 mg/ml  
■ 1.0 mg/ml

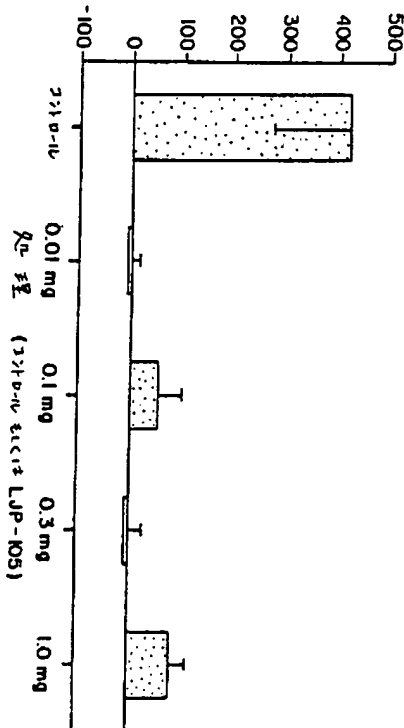
OD = 0.050 (細胞濃度)

FIG. 7



抗体経路: ip. (毎週)

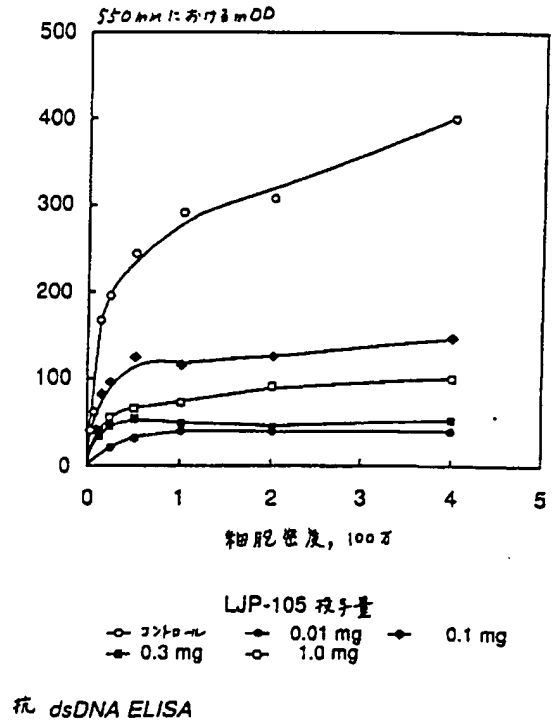
ABC±SEMの平均変化%



□ 平均値 (N=4 ~ 6)

FIG. 7A

FIG. 8



LJP-105 投与量

○ コントロール  
● 0.01 mg  
□ 0.1 mg  
■ 0.3 mg

抗 dsDNA ELISA

D-グルタミン酸とD-リジンとのコポリマーのような生体内で安定なポリマーと、少なくとも約20個の塩基対よりなる二本鎖ポリヌクレオチドとの、化学的に定義された複合体であり、この複合体は、ヒト癌腫の抗dsDNA自己抗体に対する著しい結合活性を有する。その二本鎖は、好ましくは長さおよび構造が均一であり、また各二本鎖の末端の1つにまたはその近くに位置するアミノ基に反応する官能基との間の反応により、ポリマーと結合する。これらの複合体はヒト全身性紅斑性狼瘡に対する寛容原である。

[illegible]

H	8413-4C
	8413-4C
Z	7822-4C
	8619-4H
M	8310-2J
Z	9015-2J

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067 ランチヨ サンタ フ  
エ, ランチヨ デイエグエノ ロード 6151